

MECHANIZMY MNOHOČETNÉ LÉKOVÉ REZISTENCE A JEJICH VÝZNAM PRO KLINICKOU PRAXI

I. TYPICKÁ MDR

MECHANISMS OF MULTIDRUG RESISTANCE AND THEIR CLINICAL IMPLICATIONS

I. TYPICAL MDR

NOSKOVÁ V.¹, HAJDÚCH M.¹, MIHÁL V.¹, CWJERTKA K.²

¹LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY PŘI DĚTSKÉ KLINICE LF UP A FN OLMOUC

²ONKOLOGICKÁ KLINIKA LF UP A FN OLMOUC

Souhrn: Chemoterapie nádorových onemocnění je dnes rovnocenná s chirurgickou léčbou a radioterapií. Jednou z nejzávažnějších komplikací a příčinou jejího selhání je schopnost nádorových buněk odolávat účinkům cytotoxických látek. Článek podává přehled současných znalostí o problematice lékové rezistence maligně transformovaných buněk se zaměřením na mnohočetnou lékovou rezistenci (MDR). Jsou popsána kritéria dle kterých se MDR dělí na typickou (klasickou) a atypickou. Typická MDR je způsobena membránovým P-glykoproteinem (Pgp) o molekulové hmotnosti 170 kDa patřícího do rodiny ABC-transportních proteinů. Je popsán jeho výskyt u široké škály organismů, jeho struktura a funkce i hypotézy snažící se osvětlit jeho širokou substrátovou specifičnost. Pozornost je věnována i přirozené expresi Pgp v lidských tkáních. V druhé polovině jsou uvedeny studie zabývající se významem Pgp pro klinickou MDR a to jak u hematologických nádorových onemocnění, tak u solidních tumorů.

Clíčová slova: mnohočetná léková rezistence, P-glykoprotein, ABC-transportní proteiny, chemosenzitory, mdrl gen, chemoterapie

Summary: Surgery, radiotherapy and chemotherapy are 3 most effective ways to treat malignant diseases today. One of the most serious complications and also reason of chemotherapy failure is an ability of tumor cells to resist cytotoxic agents. This paper reviews drug resistance issue of malignant cells and is focused on multidrug resistance (MDR). Criteria are given to divide MDR to 2 groups: typical (classical) MDR and atypical MDR. Classical MDR is caused by membrane P-glycoprotein (Pgp). This 170 kDa protein belongs to a superfamily of ABC-transport proteins. Pgp molecule is described here as for its structure, functions, and natural expression in human tissues. Hypothesis trying to explain its broad specificity are given as well as its presence in organisms ranging from bacteria to man. Studies dealing with significance of Pgp for clinical MDR in hematological malignancies and solid tumors are also reported.

Keywords: multidrug resistance, P-glycoprotein, ABC-transport proteins, chemosensors, mdrl gene, chemotherapy

I. Obecný úvod k MDR

Ačkoliv se chemoterapie nádorových onemocnění stala na přelomu 60. a 70. let rovnocennou s chirurgií a radioterapií, zůstává stále klíčovým problémem odhad účinnosti cytostatické léčby v eradikaci nádoru a současně míry její toxicity pro pacienta. Definovat všechny okolnosti ovlivňující účinnost cytostatické léčby a příčiny variabilní odpovědi onkologických pacientů na ni je velmi obtížné. V zásadě je však můžeme rozdělit do dvou skupin:

1. závislé od pacienta (věk, pohlaví, renální a jaterní funkce, vazebná kapacita plazmatických proteinů, souběžná léčba jinými medikamenty... atd),
2. závislé od nádoru (typ, lokalizace, rozsah, agresivita, metastatická aktivita, předchozí léčba... atd).

Jednou z nejzávažnějších komplikací protinádorové léčby a nejdůležitější příčinou jejího selhání je schopnost nádorových buněk odolávat účinkům cytotoxických látek. Maligní buněčné populace mohou být vůči chemoterapii rezistentní již při první léčbě. V tomto případě jde o tzv. přirozenou (primární) rezistenci. Získaná (sekundární) rezistence vzniká až v průběhu cytostatické léčby, kdy se původně citlivé buňky stávají rezistentními a účinnost cytostatické léčby se snižuje. Při ztrátě citlivosti k určitému cytostatiku může však být zachována citlivost k jiným léčivům. Pokud při ztrátě citlivosti k jednomu přípravku vzniká současně rezistence na jiné, většinou strukturálně příbuzné cytostatikum, hovoříme o zkřížené rezistenci. Byly však popsány případy zkřížené rezistence mezi protinádorovými léčivy lišícími se jak strukturálně, tak mechanismem účinku. Takové případy rezistence pak nazýváme mnohočetná léková rezistence (multidrug resistance, MDR). MDR vysvětluje případy necitlivosti některých nádorů k alternativním léčebným režimům, obsahujícím nové druhy cytostatik, nepoužitých v původní léčbě.

Mechanismy, kterými vzniká rezistence nádorových buněk na protinádorovou léčbu, jsou komplexnější povahy. Vznik rezistence je nejčastěji vázán na

1. **změny farmakokinetiky:** snížená resorpce cytostatika, urychlení biotransformace, rychlejší inaktivace nebo urychlené vylučování.
2. **změny cytokinetiky:** narůstání nádoru je doprovázeno přechodem větší části nádorových buněk do klidového stavu G_0 , v němž je citlivost k chemoterapii omezená. Rovněž s přibývajícím nádorovou masou vznikají spontánní mutace buněk - zvyšuje se heterogenita buněčné populace, která zakládá vznik klonu s odlišnou citlivostí k léčbě. Léčba tak ničí jen citlivou frakci buněk a dochází k selekci a následnému pomnožení rezistentní populace.

3. **strukturální a funkční změny buňky:** jde o vůbec nejčastější způsob vzniku rezistence zahrnující sníženou/zvýšenou expresi či aktivitu enzymů, porušení intracelulární distribuce cytostatika (např. vazbou na lysozom), ovlivnění transportu cytostatika buněčnou membránou, zvýšenou intenzitu oprav DNA.

II. Typická a atypická mnohočetná léková rezistence (MDR)

Mnohočetná léková rezistence byla poprvé popsána v roce 1970¹⁵ na plicní buněčné linii izolované z čínské křečka a na buněčné linii myši leukémie P388. Autoři zde pozorovali zkříženou rezistenci aktinomycin D rezistentních buněk s vinblastinem a daunomycinem. Další pracovní skupiny prokázaly, že tato zkřížená rezistence se vztahuje i na vinca alkaloidy, antracykliny, etopozid⁽¹⁵⁾ a dokonce i na mitomycin C⁽⁴⁶⁾, tedy poměrně hydrofobní léčiva s mírně zásaditým charakterem.

Vzhledem ke skutečnosti, že MDR je výraznou komplikací protinádorové léčby, probíhá na tomto poli v posledních dvou desetiletích intenzivní výzkum. Byly popsány mechanismy s jejichž pomocí je nádorová buňka schopná úspěšně odolávat chemoterapii, identifikována cytostatika po jejich podání se může vyvinout MDR a cytostatika, která nejenže nevyvolávají MDR, ale jsou účinná i u nádorových buněk s MDR fenotypem (Tab. 1).

Mnohočetná léková rezistence se tak rozděluje do dvou skupin. Typická (klasická) MDR je způsobena membránovým glykoproteinem, který je produktem mdrl genu. Tento P-glykoprotein (Pgp) je ATP dependentní membránová pumpa exportující toxické látky z buňky a způsobující tak sníženou intracelulární akumulaci léčiva. Z terapeutického hlediska je důležitou vlastností typické MDR možnost jejího obejití pomocí chemosenzitorů - látek, obnovujících vnímavost MDR buněk k protinádorové léčbě^(7-55,84,114,146,183,185). Za všechny jmenujme alespoň verapamil, cyklosporin A a jeho neimunosupresivní a méně toxický derivát PSC-833. Přehled chemosenzitorů uvádí Tab.2.

V současnosti však bylo popsáno, že MDR modulatory kromě přímé vazby na Pgp, mají společný i zásah do metabolismu lipidů - v MDR rezistentních buňkách blokuje konverzi ceramidů na glykosylceramidy. Glykosylceramidy jsou prekurzory pro syntézu glykosfingolipidů a podílí se i na regulaci buněčné proliferace. Naopak ceramidy mohou aktivovat transkripční faktory - nukleární faktor κB (NF- κB) a AP-1. Mají tedy klíčovou úlohu v signalizaci apoptózy. Na základě těchto pozorování autoři konstatují, že zvýšená schopnost některých nádorových buněk konvergovat toxické ceramidy na netoxické glykosylceramidy a následná pří-

Tab. 1: Výskyt mnohočetné lékové rezistence u některých cytostatik

MDR častá	MDR vzácná
Aktinomycin D	bleomycin
doxorubicin	cisplatina
daunorubicin	cyklofosfamid
vepesid	cytosin arabinosid
mitoxantron	5-fluorouracil
taxol	ifosfamid
vinkristin	metotrexát
	topotekan

Tab. 2: Látky obnovující *in vitro* vnímavost MDR nádorových buněk na cytostatika

Blokátory kalciového kanálu	Imunosupresivní látky
Verapamil (6-10 uM)	Cyklosporin A (0,8-2 mM)
Nifedipin (35 uM)	11-Methyl-leucine-cyclosporine (1uM)
Nikardipin (3-10uM)	SDZPSC833 (0,1uM)
Niguldipin (10 uM)	SDZ 280-446 (0,1 uM)
Bepiridil (4 uM)	FK506 (3 uM)
PAK-200 (5 uM)	Rapamycin (3 uM)
Antagonists kalamodulinu (CaM)	Antibiotika
Trifluoperazin (3-5uM)	Cefoperazon(1000uM)
Prochlorperazin (4 uM)	Ceftriaxon(1000uM)
Fluphenazin (3uM)	Erythromycin (650 uM)
trans-Flupenthixol (3-5 uM)	Tetracyklin (4000 uM)
Necytotoxické antracykliny a vinca alkaloidy	Různé hydrofobní a kationické sloučeniny
Vindolin (20-50 mM)	Dipyridamol (5-10 uM)
	BIBW22(1 uM)
Steroidy a hormonální antagonisté	
Progesteron 2 uM)	Quanidin (10 mM)
Tamoxifen (3-10 uM)	Chloroquin 10-50 uM)
Toremifen(5-10uM)	Terfenadin (3-6 uM)
Megestrol acetát (5 uM)	Reserpin (5 uM)
	Yohimbin (5 uM)
	Amiodaron (5 uM)
	SolutolHS14(4-14uM)

Pozn.: Koncentrace uvedené v závorkách obnovují vnímavost *in vitro*

tomnost zvýšeného množství glykosylceramidů v buňce jsou rozhodujícími činiteli MDR^(82,116).

Jako atypická MDR (at-MDR) jsou souhrnně označovány všechny mechanismy mnohočetné lékové rezistence na kterých se neúčastní Pgp. Atypická MDR může být způsobena změnou subcelulární distribuce léčiva, poškozením cílové struktury léčiva, rozdílnou kapacitou DNA opravných procesů či změnami detoxifikačních metabolických drah buňky. Od typické se odlišuje především tím, že nezahrnuje rezistenci na vinca alkaloidy. Z klinického hlediska nebyly k obejití at-MDR nalezeny žádné spolehlivé preparáty. Atypická MDR je asociována zejména s následujícími proteiny: multidrug resistance associated protein (MRP), lung resistance related protein (LRP) a sp izoformou enzymu glutathion-S-transferazy (GST-p).

111. Změny u MDR buněk

Změny, které pozorujeme u MDR buněk lze rozdělit do 3 hlavních skupin:

1. fyziologické změny MDR buněk ovlivňující strukturu plazmatické membrány, cytoplazmatické pH, ve zvýšené míře probíhá intracelulární transport a exocytóza přes plazmatickou membránu; rovněž je pozorována zvýšená vakuolizace buněk a změny struktury i funkce lyzozomů
2. změny v expresi a aktivitě některých buněčných proteinů
3. snížená schopnost MDR buněk akumulovat cytotoxická léčiva. Většina cytotoxických léčiv jsou slabé zásady jejichž pH se pohybuje v rozmezí 7,4 - 8,2^(45,129,156). V neutrálním prostředí jsou tyto látky hydrofobní, snadno prostupují plazmatickou membránou. Dojde-li intracelulárně k okyselení léčiva, stane se pro něj cytoplazmatická membrána nepropustná. Po prostupu buněčnou membránou se cytotoxická látka kumuluje primárně v kyselých buněčných organelách, např. Golgiho aparát, lyzozomy (11.54.182) Mechanismus, který způsobí zvýšený záchyt sloučenin v příslušných organelách vyústí ve snížení jejich koncentrace v cytoplaz-

mě i v jádře a tím umožní přežití buňky. Změny buněčného pH ovlivňují míru jak intracelulárního transportu, tak vlastní exocytózy⁽¹⁷⁵⁾. Relativní poměr mezi neutrální a okyselenou formou léčiva tedy určen koncentrací protonů. Bylo prokázáno, že pH v nádorových buňkách je výrazně kyseléjší (pohybuje se v rozmezí 5,8-6,4) v porovnání s nenádorovými buňkami⁽¹²³⁻¹⁵⁴⁾. Rovněž bylo pozorováno, že MDR buňky mají zásaditější pH oproti nádorovým buňkám vnímavým na cytotoxické látky⁽⁹¹⁾. Navíc, u senzitivních buněk byl pozorován posun jejich intracelulárního pH do zásadité oblasti poté, co byly transfekovány P-glykoproteinem⁽¹⁷⁶⁾. Tento posun byl sám o sobě (bez přítomnosti kteréhokoliv z proteinů asociovaných s MDR) dostačující ke snížení akumulace i léčiva v buňce pozorované při MDR⁽¹⁵⁴⁾. U látek okyselujících cytoplazmu (např. amilorid) byla popsána schopnost zvrátit MDR⁽²⁰⁾.

Fyziologickými změnami MDR buněk však nebylo možno spolehlivě objasnit všechny případy MDR a výzkum se zaměřil na analýzu proteinů buněk s MDR fenotypem. Bylo posáno několik proteinů, lokalizovaných ať už přímo v buněčných membránách, cytoplazmě či v jádru buňky, jejichž nadměrná exprese je asociována s MDR. Prvním objeveným, nejznámějším a dnes zřejmě klinicky nejvýznamnějším je P-glykoprotein (Pgp, P170). Později byly na modelech rezistentních buněčných linií selektovány na rezistenci vůči různým cytostatikům identifikovány i další proteiny, jejichž exprese či aktivita je proti vnímavým buňkám změněna. Mezi tyto proteiny patří např. multidrug resistance protein (MRP), lung resistance protein (LRP), p izoenzym glutathion-S-transferazy (GST-π), thymidylát syntetáza, alkyltransferáza (DNA reparační enzym), metalothionein, jaderný enzym topoizomeraza II (Topo II)⁽¹⁵⁵⁾ a další.

V poslední době se množí údaje, že kromě uvedených mechanismů se na vzniku nádorové rezistence podílí také skupina genů/proteinů kontrolujících buněčný cyklus, DNA reparaci a apoptózu. Nejznámějším z nich je protein p53. Tento onkosupresor je transkripčním faktorem jehož exprese je aktivována poškozením DNA. Aktivace p53 kaskády vede následně k transkripci p53 dependentních genů např: p21^{WAF1}, bax, GADD45. Je obecně známou skutečností, že mutace v genu p53 zhoršují prognózu nemocného, zvyšují jeho rezistenci k chemoterapii a radiačnímu záření. Předpokládá se, že v takto mutovaných buňkách vystavěných genotoxickým vlivům nedochází k expresi pro-apoptotického genu bax a současně buňky ztrácejí kontrolu nad G1/S přechodem buněčného cyklu v důsledku nízké exprese proteinu p21^{WAF1}^(63,168). Rovněž bylo zjištěno, že buněčné linie s homozygotní delecí proteinu p21^{WAF1} jsou hypersenzitivní k chemoterapeutikům *in vitro*⁽¹⁸⁰⁾. Z těchto literárních údajů vyplývá, že přinejmenším dva proteiny ze skupiny regulátorů buněčného cyklu, t.j. p53 a p21^{WAF1}, jsou přímo asociovány se vznikem nádorové rezistence. Doposud však existuje málo informací o vzájemném propojení těchto dvou proteinů i o způsobu, kterým se podílejí na vzniku MDR.

V další části této práce se budeme věnovat pouze čtyřem nejdůležitějším proteinům, jejichž nadměrná exprese je asociována s MDR a které se jeví z klinického hlediska jako významné - Pgp, MRP, LRP a GST-7L

IV. Rodina ABC-transportních proteinů

Toxické sloučeniny jsou součástí životního prostředí organismů. Z evolučního hlediska bylo důležité aby si organismy vyvinuly strategie umožňující přežití v takovýchto podmínkách. Součástí těchto mechanismů jsou proteiny plazmatické membrány umožňující transport toxinů z buňky. Tyto membránové transportní proteiny nacházíme na všech úrovních organismů od bakterií po člověka⁽¹⁷⁹⁾ a obecně se podílí na transportu širokého spektra látek (iontů, aminokyselin, cukrů, peptidů a proteinů) přes buněčnou membránu. Mezi takové transportní proteiny se širokou substrátovou specifiitou a obsahující ATP-vazebnou kazetu patří tzv. ABC-transportní proteiny (z angl. ATP-binding cassette). ABC-transportní proteiny tvoří superrodinu, která v současné době zahrnuje přes 50 bílkovin vykazujících rozsáhlou sekvenční homologii funkčních domén. Jejich dalším společným znakem je využívání energie fosfátových vazeb k exportu toxických látek z buňky⁽⁷⁰⁾. Z hlediska seskupení aminokyselinových zbytků v ATP-vazebné kazetě, topologie proteinů a substrátové specifity se nadrodina ABC-transportních proteinů dělí do dvou podskupin: Pgp podskupina a MRP podskupina.

Bílkoviny patřící do Pgp podskupiny mají klíčovou úlohu v rezistenci mikroorganismů na neutrálně či pozitivně nabitě amfifilní sloučeniny. Nacházíme je v lidských patogenech např. *Plasmodium falciparum* (pMDR1 gen jehož mutace odpovídá za rezistenci vůči antimalarické léčbě), *Entamoeba histolytica* (enhPgp), *Leishmania donovani* (IdMDR), *Saccharomyces cerevisiae* (STE6 exportující sexuální feromon)⁽¹⁴³⁾. Pgp podskupina ABC-transportních proteinů byla dále identifikována u bakterií, např. *Streptomyces* (DrrAB), *Lactococcus lactis* (LmrA), *Escherichia coli* (a-hemolysin transportní protein HlyB)^(51,56); u hmyzu - *Drosophila melanogaster* (mdr49, mdr65, mdr50)⁽¹⁸⁶⁾; u vyšších rostlin - *Arabidopsis thaliana* (atpgpl, který byl nalezen ve všech zkoumaných částech rostliny včetně listů, kořenů, květních pupenů a květu)⁽⁴⁷⁾; u nižších živočichů - *Caenorhabditis elegans* (Celpgp). Z lidských genů/proteinů sem kromě Pgp⁽⁶¹⁾ patří i gen pro cystickou fibrózu - CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductor regulator)⁽¹⁴⁰⁾. Rovněž transportní proteiny TAP1 a TAP2 asociované se zpracováním antigenů molekulami hlavního histokompatibilního komplexu I. třídy a jeho prezentací jsou součástí Pgp podskupiny nadřodiny ABC transportních proteinů⁽¹³⁰⁾.

Bílkoviny MRP podskupiny umožňují mikroorganismům exportovat různé organické anionty, např. deriváty karboxyfluoresceinu, bis(glutathion) kadmium a jiné glutathion-S konjugáty. K nejlépe charakterizovaným proteinům z této skupiny patří Ycf1 (yeast cadmium factor) a Yor1 protein v *S. cerevisiae*, cMRP1 (*Caenorhabditis elegans*), BCECF (*L. lactis*)⁽¹⁷⁹⁾ a lidský MRP⁽³⁵⁾.

V poslední době k nim přibýly i Multispecific Organic Anion Transporter (MOAT), Epithelial Basolateral Conductance Regulator (EBCR) - pravděpodobně jde o králičí ortolog proteinu MOAT, sulphonylurea receptor (SUR protein) korigující průchodnost K⁺ iontového kanálu a uvolňování inzulinu⁽²⁴⁶⁾.

Kvasinkový STE6 a savčí Pgp vykazují 57% homologii v uspořádání aminokyselin, rovněž mají podobnou sekundární strukturu a membránovou topologii⁽¹¹⁷⁾. Tato strukturální podobnost mezi různými typy ABC-transportních proteinů může vyústit v podobnost funkční. Bylo zjištěno, že myši Pgp homolog mdr3 či plasmodiální pMDR může zastoupit funkci STE6 v kvasinkách s mutantním a tudíž nefunkčním proteinem⁽¹³⁷⁾. Funkční substituce ABC-transportních proteinů není vázána pouze na eukaryotické transportní proteiny. Bylo prokázáno, že bakteriální LmrA je schopný funkčně zcela zastoupit lidský Pgp v lidské línii plicních fibroblastů. Navíc byl LmrA lokalizován do plazmatické membrány stejně jako Pgp⁽¹⁷⁹⁾. Na základě této pozoruhodné funkční shody různých typů ABC-přenašečů byla vyslovena domněnka o velmi podobném mechanismu působení těchto proteinů v prokaryotických i eukaryotických buňkách.

Bylo vysloveno několik hypotéz o mechanismech, kterými probíhá transport toxických látek přes ABC-transportní proteiny sázející se vysvětlit jejich širokou substrátovou specifitu. První z nich je tzv. hypotéza konvenčního transportu (conventional transport hypothesis)⁽⁴⁾. Transport substrátu z cytoplazmy buňky probíhá přes vodní poruš s velice příznivým vazebným místem pro substrát. Druhá hypotéza je označována jako „model hydrofobního vakuového čističe“, (vacuum cleaner hypothesis)⁽¹³⁵⁾. Podle ní mají ABC-přenašeče schopnost rozeznat lipofilní sloučeniny díky jejich interkalaci do lipidové dvojvrstvy plazmatické membrány. Z ní jsou následně transponovány mimo buňku aniž dosáhly cytoplazmy. Třetí model, tzv. „flippase hypothesis“,^(19,71) předpokládá transport toxických sloučenin z vnitřní strany lipidové dvojvrstvy plazmatické membrány na vnější (Obr.1). Detailněji byl studován bakteriální ABC-přenašeč LmrA a LmrP⁽¹⁸⁾. Ve studii bylo použito amfifilní membránové próby TMA - DPH (1-(4-(trimethylamino)fenyloxy)-6-fenylhexa-1,3,5-trien) a ze způsobu jejího prostupu membránou byl učiněn závěr, že oba sledované ABC-přenašeče vylučují TMA - DPH próbu z vnitřní strany lipidové dvojvrstvy. Toto pozorování tedy podpořilo výše uvedený model hydrofobního vakuového čističe.

V. P-glykoprotein (Pgp)

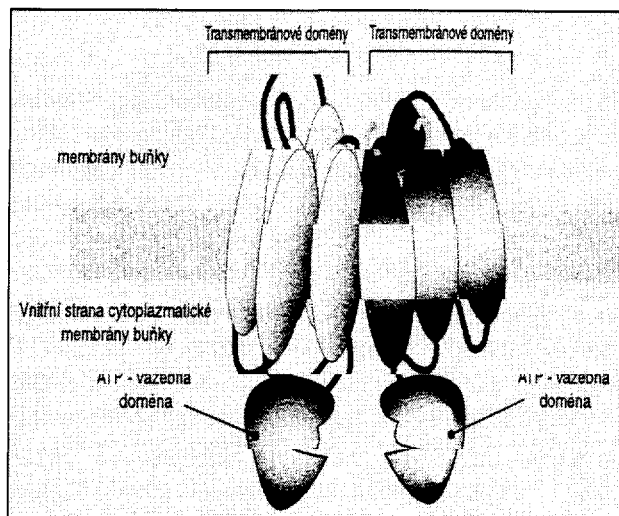
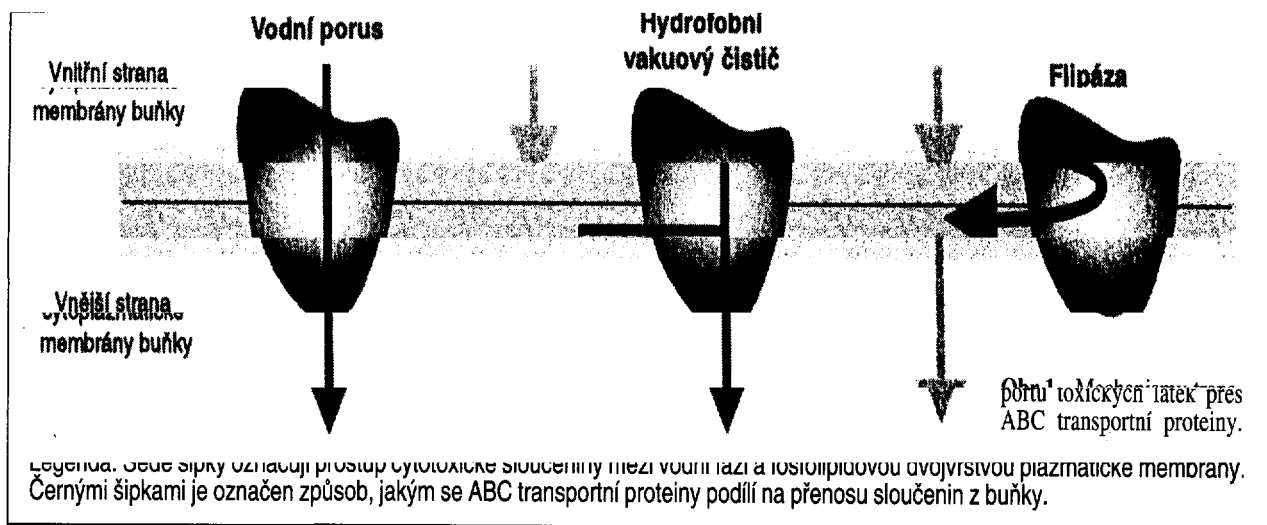
V roce 1976 demonstrovala Torontská skupina⁽⁸⁵⁾ že zkřížená rezistence je způsobena sníženou akumulací léčiva v buňce. Následně bylo pozorováno, že tento jev koreluje s výskytem glykoproteinu plazmatické membrány nazvaného P-glykoprotein, kde P označuje zvýšenou permeabilitu⁽⁸⁶⁾, neboť jeho původně předpokládanou funkcí byla regulace propustnosti buněčné membrány. Molekulová hmotnost P-glykoproteinu je 170 kDa. Zvý-

šená exprese P-glykoproteinu byla u některých MDR linií v souladu s amplifikací genu mdr1 kódujícího Pgp⁽¹³⁹⁾. Molekulu Pgp tvoří 1280 aminokyselin⁽³⁰⁾. Strukturně je Pgp multifunkční polypeptid složený ze dvou homologních polovin z nichž každá má ABC doménu i membránovou doménu. Obě poloviny jsou odděleny vysoce nabitým „spojovačem“, - oblastí, která je na několika místech fosforylována protein kinázou C *in vitro* i *in vivo*⁽⁷²⁾. Všechny transmembránové domény Pgp molekuly vytváří obrovský vodní porus mající v průměru 5 nm. Je tedy zřejmé, že obě homologní poloviny molekuly musí spolupracovat, aby vytvořily jednu funkční transportní bílkovinu (Obr.2, Obr.3). ABC domény jsou lokalizovány do cytoplazmy buňky, tedy na vnitřní straně membrány a navzájem vykazují 30-40% aminokyselinovou homologii. Zhruba stejná homologie je nacházena i v ABC doménách dalších přenašečů patřících do nadřodiny ABC transportních proteinů. Studie s fotoaktivním analogem ATP prokázaly, že P-glykoprotein váže ATP na malý tryptický fragmen své ATP vazebné domény⁽¹⁵¹⁾. Mutace indukované v tomto umístění měly za následek ztrátu funkce P-glykoproteinu. Rovněž delece provedené na C- či N-konci molekuly Pgp měly za následek ztrátu jeho membránové funkce. Obě koncové oblasti mají tedy klíčový význam pro správnou funkci molekuly⁽³⁹⁾. Membránová doména se skládá ze 6 transmembránových segmentů (α-helixů). Ty formují vazebná místa pro transponovaný substrát a alosterické regulátory. Nicméně není ještě přesně známo, které aminokyselinové zbytky se přímo podílí na interakci se substrátem. Fosforylované „spojovač“, není potřebný pro vlastní aktivní transport⁽⁶²⁾, spíše upravuje schopnost Pgp regulovat heterologní iontové kanály. Molekula P-glykoproteinu je v rámci posttranslačních úprav glykosylována a fosforylována. Jediné glykosylační místo je lokalizováno extracelulárně na N-polovině Pgp molekuly (Obr.3)⁽¹⁴⁾.

V závislosti na glykosylaci může molekulová hmotnost Pgp kolísat v rozmezí 135-180 kDa⁽⁴⁹⁾. Neproběhnutí glykosylace však nemá žádný efekt na míru lékové rezistence buněčných linií⁽¹⁰⁾. Kromě glykosylace je Pgp v plazmatické membráně rovněž fosforylován a defosforylován a to na několika místech včetně Ser a Thr zbytků⁽⁶⁶⁾. Na rozdíl od glykosylace však fosforylace moduluje aktivitu Pgp a tedy i míru lékové rezistence. Bylo demonstrováno⁽⁶⁶⁾, že chemosenzitivizační látky zvyšují míru fosforylace Pgp u MDR buněk. Na fosforylaci P-glykoproteinu se podílí protein kináza C a cAMP - dependentní protein kináza A^(1,18,16,1). Defosforylace probíhá za přispění Ser/Thr fosfatáz PPI a 2A⁽²⁵⁾ (Horio et al⁽⁷⁵⁾) studovali rychlost transportu přes plazmatickou membránu. U dobře propustné membrány byla maximální rychlost transportu 5 pmol přenesené látky na 1mg váhy všech membránových proteinů za 10 minut. Autoři vyhodnotili podíl Pgp v celkovém zastoupení všech membránových proteinů jako 1%⁽⁵⁾ což by znamenalo, že molekula Pgp transponuje jednu molekulu substrátu za 1,9 hodiny. MDR buňky kultivované s 6mM koncentrací kolchicinu (koncentrace jen o málo vyšší, než jaká se používá v léčebných protokolech) však vykazovaly podstatně nižší rychlost transportu - molekula Pgp přenesla molekulu substrátu za 10 hodin. Tato rychlost je o mnoho řádů pomalejší v porovnání s dalšími transportními proteiny a rovněž neodpovídá relativně rychlému hromadění léčiva v buňce.

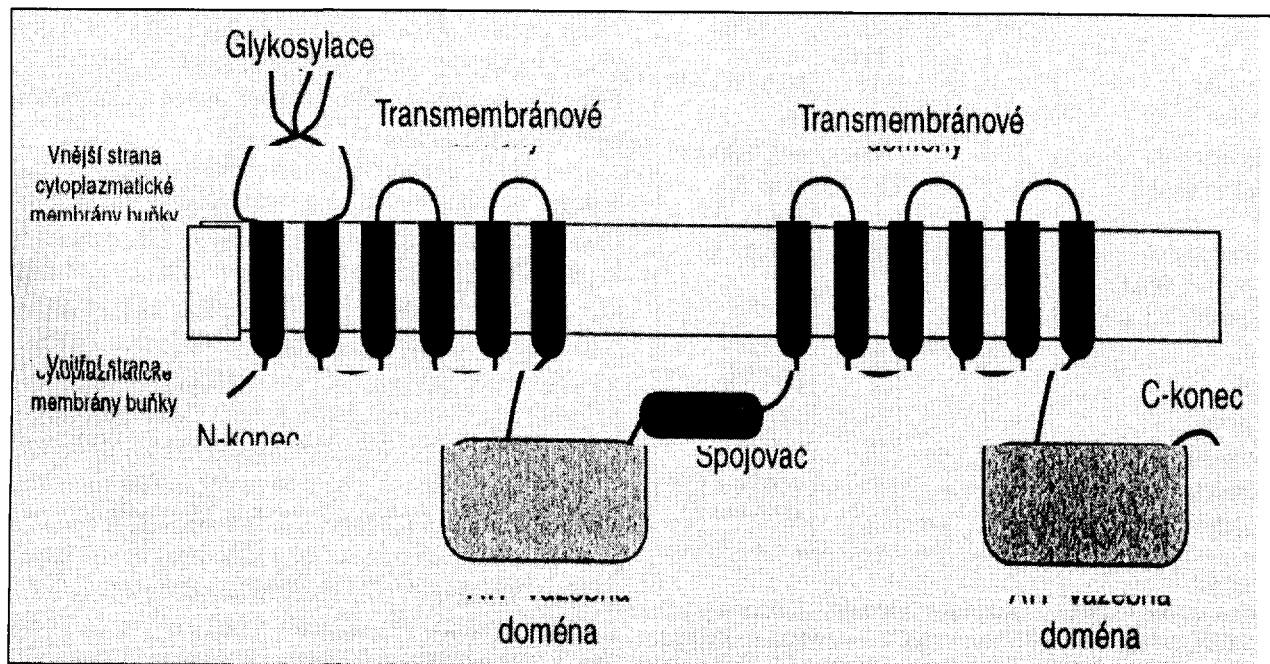
Dle struktury P-glykoproteinu a rovněž s přihlédnutím k faktu, že do skupiny Pgp homologních proteinů patří CFTR protein, jehož nadměrná exprese koreluje se zvýšeným počtem iontových kanálů⁽¹⁷⁴⁾, lze usuzovat, že Pgp má v buňce dvojí funkci. Jednak coby ATP-dependentní membránová pumpa odstraňuje toxické látky z buňky a rovněž se podílí na regulaci iontových kanálů. V epitelu tenkého střeva byla pozorována záměna exprese CFTR za Pgp jak buňky migrovaly přes hranici krypty-kilky⁽¹⁷²⁾. Tentýž jev byl pozorován i v epitelu dělohy na počátku těhotenství. Zjištění, že nadměrná exprese Pgp je průvodním jevem zvýšené aktivity chloridového kanálu⁽¹⁾ nebylo překvapující. Obě funkce P-glykoproteinu v buňce však probíhají nezávisle na sobě, jak bylo prokázáno v mutagenních studiích⁽⁶⁾. Na buněčné línii P388 bylo zjištěno, že Pgp exprese rovněž koreluje se zvýšenou mírou exocytózy lysozomálních enzymů⁽¹³⁵⁾.

V rámci evolučních studií byla identifikována řada izoforem Pgp, které jsou kódovány rodinou příbuzných genů. Tyto genové rodiny se označují jako pgp geny u křečků a krys, mdr geny u lidí a myši⁽¹⁵⁷⁾. U člověka byly identifikovány 2 izoforymy Pgp (mdr1 a mdr3), které vykazují 80% homologii na úrovni aminokyse-

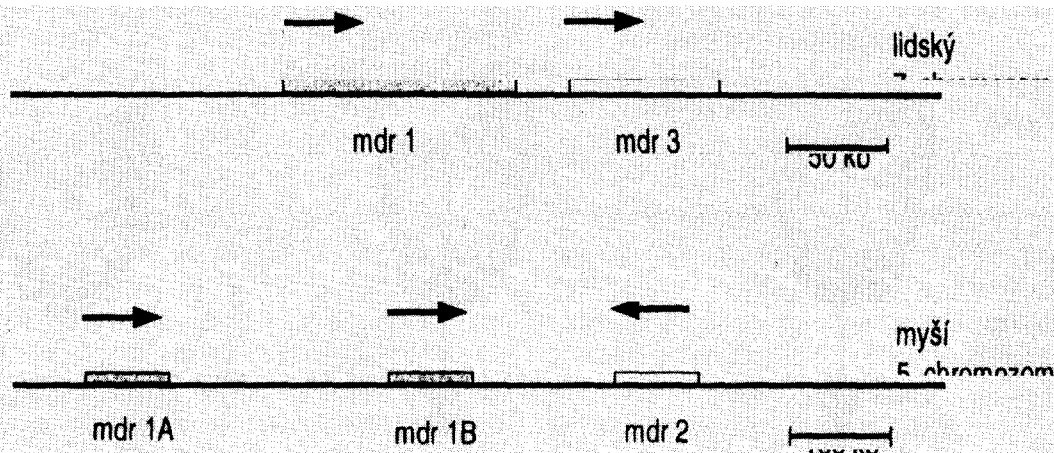


Obr2. - Model sekundární struktury ABC transportního proteinu patřícího do Pgp podskupiny.

lin^(42,65). Oba lidské *mdr1* a *mdr3* byly lokalizovány na dlouhém raménku 7. chromozómu (oblast *a36*)⁽¹³⁾ a jejich vzájemná vzdálenost je 1,4 kb (Obr.4). Funkce obou genů *mdr1* a *mdr3* v navození kompletního MDR fenotypu po transfekci buněčné linie expresním vektorem se zaklonovanou *mdr1* cDNA⁽⁶⁵⁾. Nicméně kázaly účast tohoto genu v navození lékové rezistence⁽¹⁴⁹⁾. Rovněž myší gen *mdr2* není schopen navodit lékovou rezistenci. Lid-jeden z nich není nadměrně exprimován v nepřítomnosti *mdr1/mdr1a*, *mdr1b* genů⁽¹³⁶⁾, mezi oběma geny existuje 95% podobné, že oba geny budou mít ve svých mateřských orga-nismech podobnou funkci. Myší *mdr2* proteiny se přirozeně vysky-úspěšně provedené nulové mutaci *mdr2* lokusu⁽¹⁵⁹⁾ byly na mutantních myších pozorovány patologické změny jater zapříči-řvali, že sledovaný protein se může podílet na transportu fosfoli-pidů. Pozorování bylo podpořeno zjištěním, že lidský *mdr3* protein je specifický přenašeč fosfolipidů⁽¹⁷⁷⁾. K analýze přirozené exprese *mdr* genů v lidských tkáních bylo použito *mdr1* cDNA prob nebo Pgp specifických protilátek. Nej-



Obr3 - Terciární struktura glykoproteinu.



Legenda: Šipky označují směr transkripce. Myší schéma je znázorněno v dvakrát větším měřítku než lidské.

Obr.4 - Schema rozmístění lidských a myších genů pro P-glykoprotein na chromozomech.

vyšší hladina exprese mdrl P-glykoproteinu byla pozorována v nadledvinkách, v lumen ledvin, jater a střeva⁽⁵³⁾. V menší míře lat⁽³⁸⁾, v placentárních trofoblastech⁽¹⁶³⁾ a rovněž na některých CD34+ hemopoetických kmenových buňkách. Nejvyšší hladina rech⁽¹⁷⁶⁾. PCR analýza však odhalila nízkou expresi mdrl3 produktu rovněž v ledvinách, slezině, kostní dřeni a nadledvinkách⁽³¹⁾.

VI. Výskyt MDR asociovaných proteinů v lidských nádorech
Jeden z prvních důkazů klinické MDR demonstrovaný na pricím nádorém prsu či ovária poskytl opět Ling, který pozoroval sníženou schopnost těchto buněk akumulovat cytotoxická léčiva⁽⁹⁾. Nádorových buňkách odebraných od pacientů, kteří klinicky projevovali všechny znaky MDR⁽¹²⁾. Od té doby začal vzrůstat (Tab.5).

Tab. 5: Lidské nádory exprimující P-glykoprotein

Nádor	Přidá-	Po chem-	Metoda	Léčba
Ovariální	-	+	WB	MLP, CYC, DOX,
Prsní	+	ND	WB	-
tlustého střeva	+	+	NB	5FU, MMC
řikání	-	-	WB	ACT-D, DTIC, CYC
Akutní nelym-	-	+	Ic	DNR, VP-16
Sekundární akutní nelym-	+	ND	Ic	DOX, VCR, BUS
foblastická leukémie	-	-	-	-
CML - blastická krize	-	+	If, NB	BUS, VCR, DOX
NHL	-	+	Ic	Dox, VCR
Neuroblastom	-	+	NB	VCR, DOX
Nadledvin	+	ND	NB	-
Ledvin	+	ND	NB	MTX, ARA-C

Legenda:

+ pozitivní, - negativní, ND nedetekováno, WB western blot, NB nothern blot, Ic imunocytochemie, If imunofluorescence, ACT-D aktinomycin D, platina, DNR daunorubicin, DOX adriamycin, DTIC dakarbazin, 5FU 5-fluorouracil, MLP melfalan, MMC mitomycin C

Problémem některých solidních nádorů je jejich neodpovídavost na protinádorovou chemoterapii v důsledku primární či získané ba vystředána progresi onemocnění. Přitom je jak při primární tak získané rezistenci mnohem častěji klinicky pozorována MDR nikoliv pouze na jednu látku či třídu látek⁽¹⁰²⁾.

Z důvodu stanovení potenciální úlohy mdrl v predikci odpovědi na cytostatickou léčbu byla podrobně studována jeho exprese v klinické lékové rezistenci vůči cytotoxickým látkám, transportovaným Pgp, a zvýšenou expresí mdrl mRNA nebo přímo bu Pgp netransportovanými léčivy či pro použití chemosenzitizátorů. K detekci se používají mdrl cDNA próby nebo anti-Pgp protilátky⁽⁵⁴⁾. První velké studie, která analyzovala klinický materiál pocházející od Goldsteina a spolupracovníků⁽⁵⁵⁾. Nadměrná exprese Pgp je častěji nalézána v již léčených nádorech. Výjimkou z tohoto pravidla je zvýšená exprese mdrl v neléčených nádorech: oboustranný karcinom, nádory ledvin, pankreatu, hepatomy či tumory žlázy nadledviny. Řada dalších příloh zvýšené hladiny mdrl mRNA (karcinomy prsu, nemalobuněčné nádory plic, karcinom žaludku, karcinom prostaty, chronická myeloidní leukémie (CML)).

Studie na modelu dětských nádorových nemocí prokázala silnou vazbu mezi expresí Pgp, neodpovídavostí na chemoterapii, kratší a kratší délkou dlouhodobého přežívání (long term survival)⁽⁶⁾. Chan a spolupracovníci retrospektivně analyzovali biptické vzor-imunohistochemicky a prokázali vysoce významný rozdíl v různých parametrech přežívání po léčbě protokoly, které obsahovakomem nebo s nediferencovaným sarkomem tíž autoři zjistili, že přítomnost nebo nepřítomnost Pgp neměla prediktivní hodnotu odpovědi⁽²⁶⁾. Prediktivní hodnota exprese Pgp se však výrazně zvýšila ve vztahu k parametrům dlouhodobého přežití nebo v prakticky potvrzují známou skutečnost, že klinická remise v podstatě znamená naši neschopnost prokázat onemocnění v případě, Žatímco chemoterapie u Pgp pozitivních pacientů pouze redukuje nádorovou masu, u Pgp negativních nemocných může vést ke čených dětských malignit prognosticky vysoce významná. Takto provedené studie však nezodpověděly otázku, zda zhoršená odpo-

vídavost na léčbu u Pgp pozitivních pacientů je pozorována v důsledku specifického uplatnění Pgp v navození klinické rezistence a následným léčebným selháním, nebo zda je Pgp pouze indikátor více maligního fenotypu a tedy špatným prognostickým znakem. Rada studií zahájená na začátku 90. let se snaží prozkoumat význam Pgp v mnohočetné lékové rezistenci měřením jeho množství při diagnóze a v relapsu po léčbě cytostatiky, které se uplatňují v mechanismech MDR. Studie se prováděly na mnohočetném myelomu^(50,145) či na ovariálních a malobuněčných plicních karcinomech⁽⁷⁴⁾. Ve studiích na ovariálních a malobuněčných plicních karcinomech byla nalezena vysoce signifikantní korelace mezi nepřítomností Pgp mRNA a odpovědí nemocného na chemoterapii. Na druhé straně byla pozorována klinická rezistence vůči látkám, které nejsou transponovány Pgp, což svědčí pro koexistenci několika různých mechanismů odpovídajících za lékovou rezistenci v rámci heterogenní nádorové populace. Nejlepším modelem pro studium klinického významu Pgp, zejména jeho významu v navození MDR jsou hematologické malignity a to vzhledem k možnosti snadných a opakovaných odběrů. Zvýšená exprese mdrl byla prokázána u 19% nemocných trpících ALL, AML⁽¹⁴¹⁾, nebo CML v blastické krizi v iniciační fázi nemoci a u 50% nemocných v relapsu. Přítomnost Pgp byla prokazatelně špatným prognostickým faktorem. Rovněž byla zjištěna statisticky významně nižší pravděpodobnost dosažení kompletní remise v přítomnosti zvýšené exprese mdrl⁽¹¹³⁾. Za zmínku stojí také studie provedená na leukemických klonách izolovaných od 22 pacientů s AML, ve které byla analyzována chemosenzitivita nádorových buněk *in vitro* testem a současně exprese mdrl. Byla pozorována asociace mezi rezistencí na daunorubicin a pozitivitou buněk na mdrl, ačkoliv 40% vzorků exprimujících mdrl bylo *in vitro* senzitivních na daunorubicin. Pirker et al⁽¹³¹⁾ vyšetřovali přítomnost mdrl mRNA s použitím slot blot hybridizace u 63 pacientů s čerstvě diagnostikovanou AML. Zjistili, že kompletní remise s použitím antracyklin obsahujících léčebných protokolů bylo dosaženo u 53% pacientů pozitivních na mdrl a u 89% pacientů, jejichž myeloblasty byly negativní ($P < 0,008$). Bezpriznakové období a délka celkového přežití byly rovněž signifikantně delší u mdrl negativní skupiny. Opakovaně byly pozorovány signifikantní rozdíly v procentech dosažených kompletních remisí mezi skupinami nemocných s nebo bez zvýšené exprese Pgp. S poněkud menším zájmem byla studována přítomnost mdrl

mRNA v lymfoblastech u ALL. V několika studiích se popisuje nižší prevalence Pgp pozitivních lymfoblastů. Studie zahrnující 59 pacientů s *de novo* ALL (36 dětí a 23 dospělých) potvrdila expresi Pgp jako negativní prognostický faktorů. Rovněž byly nalezeny signifikantní rozdíly mezi skupinou Pgp pozitivních a Pgp negativních dospělých pacientů v navození remise (56% proti 93%), v trvání bezpriznakového období a v tendenci k navození druhé kompletní remise (15% proti 38%) u nemocných exprimujících Pgp ve více než 1% leukemických buněk (38%).

Výše uvedené studie potvrdily prognostický význam Pgp exprese u nemocných s leukémií avšak neposkytly důkaz o funkčním významu Pgp v primární nebo navozené klinické lékové rezistenci. Je důležité si uvědomit, že renální, adrenální a kolorektální karcinomy jsou klinicky rezistentní také vůči látkám, které nejsou transponovány Pgp (bleomycin, antimetabolity, alkylující látky). V těchto případech primární rezistence se zřejmě uplatňují jiné mechanismy vedoucí k MDR. Na druhé straně, Pgp exprese bývá zvýšena také u pacientů se sekundární (navozenou) MDR a řada z nich je současně rezistentní vůči cytostatikům, která nejsou přenášena Pgp.

Lze konstatovat, že výše zmíněné studie potvrzují přítomnost Pgp jak v normálních, tak v nádorově transformovaných lidských tkáních a ukazují, že s použitím molekulárně biologických postupů může být tato exprese v klinických vzorcích úspěšně monitorována. Při současném stavu našich vědomostí o významu Pgp v MDR lze konstatovat, že jeho exprese signalizuje pouhou přítomnost řady mechanismů lékové rezistence. K potvrzení asociace mezi primární nebo sekundární lékovou rezistencí a přítomností Pgp bude nezbytné provést analýzu vazby mezi množstvím Pgp v nádoru a odpovědí nemocného na specifická cytostatika v prospektivní studii s průběžným stanovováním kvantity Pgp u jednotlivých pacientů před léčbou a po léčbě.

PODĚKOVÁNÍ

Práce na projektu *lékové rezistence jsou financovány granty IGAMZ4132-5, MŠMT VZJ14/98151100001, VS 96154 a Nadací pro výzkum rakoviny v Olomouci.*

Literatura:

Souhrnný seznam literatury použité v obou částech přehledového článku je uveden na konci části II zabývající se atypickou MDR.